

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :

C12Q 1/68, G01N 21/64

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/47702

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

23. September 1999 (23.09.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/00729

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. März 1999 (16.03.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 11 730.2

18. März 1998 (18.03.98)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BERTLING
GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3 a, D-91056 Erlangen
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf [DE/DE];
Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49a,
D-91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING A TAG

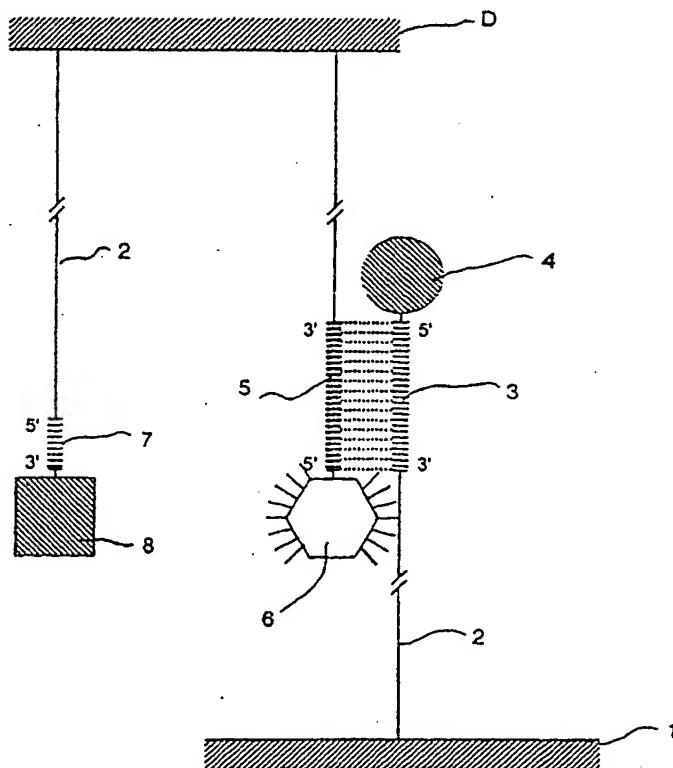
(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM IDENTIFIZIEREN EINER MARKIERUNG

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying a tag. Said tag is provided on a solid (1) and has a first nucleotide sequence (3). The first nucleotide sequence (3) is brought into contact with a detection agent which has a second nucleotide sequence (5) corresponding to the first. The second nucleotide sequence (5) is bound by its first end to a solid phase (D) and has a first fluorephore group (6) at its second end.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer an einem Festkörper (1) vorgesehenen ersten Nukleotidsequenz (3) aufweisenden Markierung, wobei die erste Nukleotidsequenz (3) mit einer zur ersten korrespondierenden zweiten Nukleotidsequenz (5) aufweisenden Detektionsmittel in Kontakt gebracht wird, wobei die zweite Nukleotidsequenz (5) mit ihrem ersten Ende an eine feste Phase D gebunden ist und am zweiten Ende eine erste fluorphore Gruppe (6) aufweist.



Verfahren und Vorrichtung zum Identifizieren einer Markierung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Identifizieren einer an einem Festkörper vorgesehenen eine
5 erste Nukleotidsequenz aufweisenden Markierung.

Aus der US 4,996,143 ist ein Verfahren bekannt, bei dem ein erster und ein zweiter Primer in einem Abstand von 2 bis 7 Nukleotiden an die nachzuweisende Nukleotidsequenz gebunden
10 werden. Der erste und der zweite Primer sind jeweils mit einem fluorophoren Molekül versehen. Im Bindungszustand kommt es infolge des Förster-Effekts zu einem strahlungslosen Energieübergang vom einem fluorophoren Molekül auf das andere. Das bewirkt eine spezifische Fluoreszenz.

15

Aus der US 5,607,834 ist es bekannt, zum Nachweis einer Nukleotidsequenz einen Primer mit einer Haarnadelschleife zu verwenden. Dabei sind an den Schleifenabschnitten der Haarnadelschleife gegenüberliegend ein fluorophores Molekül und ein
20 Quencher vorgesehen. Der Abstand zwischen dem fluorophoren Molekül und dem Quencher ermöglichen einen strahlungslosen die Fluoreszenz löschenden Energieübergang. Wenn der Primer allerdings mit einem komplementären Gegenstrang hybridisiert, wird die Haarnadelschleife geöffnet. Die eine Fluoreszenz lö-
25 schende räumliche Beziehung zwischen dem fluorophoren Molekül und dem Quencher wird geändert. Damit ist eine Fluoreszenz beobachtbar.

Die DE 195 81 489 T1 beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von Komponenten in einer Vielkomponenten-Mischung. Dabei wird ein Marker benutzt, der mindestens zwei an einem Grundgerüst gebundene fluorophore Gruppen in Energieübertragungsbeziehung aufweist. - Das bekannte Ver-
30

aufweisenden Markierung vorgesehen, wobei die erste Nukleotidsequenz mit einer zur ersten korrespondierenden zweiten Nukleotidsequenz aufweisenden Detektionsmittel in Kontakt gebracht wird, wobei die zweite Nukleotidsequenz mit ihrem ersten Ende an eine feste Phase gebunden ist und am zweiten Ende eine erste fluorophore Gruppe aufweist. - Das ermöglicht eine einfache und schnelle Identifizierung einer an einem Festkörper vorgesehenen Nukleotidsequenz. Die Herstellung einer Lösung ist dazu nicht erforderlich.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal hybridisieren die erste und die zweite Nukleotidsequenz beim Inkontaktbringen. Dabei kann vorteilhafterweise eine bestehende Hybridisierung der ersten Nukleotidsequenz mit einer dritten Nukleotidsequenz gelöst werden. Bei der Hybridisierung der ersten und zweiten Nukleotidsequenz kann eine Fluoreszenzreaktion ausgelöst werden. So ist eine einfache Identifizierung möglich.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal kann die erste Nukleotidsequenz beim Inkontaktbringen durch Magnetwirkung in Richtung des ersten Detektionsmittels bewegt werden. Das Inkontaktbringen kann auch durch Auftragen eines Gels oder einer, vorzugsweise viskosen, Flüssigkeit auf das Detektionsmittel und/oder die Markierung gefördert werden.

Zweckmäßigerweise wird vor dem Inkontaktbringen die erste Nukleotidsequenz überdeckende Schutzschicht entfernt, wobei die Markierung vorteilhafterweise auf eine Temperatur von mehr als 50°C erwärmt wird. Nach dem Inkontaktbringen wird die Markierung zweckmäßigerweise auf eine Temperatur von weniger als 50°C abgekühlt.

Die Spacermoleküle weisen vorzugsweise eine Länge von 0,2 bis 1 μ auf. Die feste Phase des Detektionsmittels kann aus einem lichtdurchlässigen Material, z.B. Kunststoff, Glas oder Quarz, hergestellt sein. Auf der Oberfläche der festen Phase kann ferner eine aus wasserbindenden Substanzen, z.B. Polyethylenglycol, Glyzerin oder dgl., hergestellte Schicht vorgesehen sein.

- 10 An einem zweiten Ende der dritten Nukleinsäure ist zweckmäßigerweise eine zweite fluorophore Gruppe oder ein Quencher vorgesehen. Die zweiten und die dritten Nukleinsäuresequenzen liegen bei der Identifizierung zweckmäßigerweise im hybridisierten Zustand vor, so dass eine Wechselwirkung zwischen dem
- 15 ersten fluorophoren Molekül bzw. dem Quencher sich ausbildet. Die sich ausbildende Wechselwirkung bewirkt entweder eine Löschung einer Fluoreszenz des ersten fluorophoren Moleküls oder auch eine besonders starke Fluoreszenzreaktion infolge eines direkten oder strahlungslosen Energieübergangs vom er-
- 20 sten auf das zweite fluorophore Molekül oder umgekehrt. Sobald die räumliche Beziehung zwischen dem ersten fluorophoren Molekül und dem zweiten fluorophoren Molekül bzw. dem Quencher geändert wird, ist eine Änderung der Fluoreszenz beobachtbar. Die Änderung der Fluoreszenz dient zur Identifizierung
- 25 der ersten Nukleotidsequenz.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, dass die erste, zweite und die dritte Nukleinsäuresequenz aus einer Desoxyribonukleinsäure (=DNA) oder peptischen Nukleinsäure (=PNA) gebildet sind. Andere, insbesondere Nuklease-

30 resistente Nukleinsäurederivate, sind ebenfalls vorstellbar.

Fig. 10 a, b eine fünfte Markierung im nichthybridisierten und im hybridisierten Zustand,

5 Fig. 11 die Fluoreszenz eines Detektornukleotids (1) ohne Markierungsnukleotid und (2) mit Markierungsnukleotid,

10 Fig. 12 a einen mit Markierungsnukleotid beschichteten Objektträger und

Fig. 12 b das Markierungsnukleotid gemäß Fig. 12 a im Hybridisierungszustand mit einem Detektornukleotid.

15
Fig. 1 zeigt eine erste Markierung im nichthybridisierten Zustand. Auf der Oberfläche eines Festkörpers 1, z.B. einer Banknote, ist kovalent ein Spacermolekül 2 gebunden. Das Spacermolekül weist eine Länge von 5 bis 10000 nm, auf. An
20 das freie Ende des Spacermoleküls 2 ist das 3'-Ende einer PNA 3 gebunden. Diese besteht aus etwa 10 bis 50 Basen. An das 5'-Ende der PNA 3 ist ein magnetisierbares Partikel 4 gebunden. Dabei kann es sich um eine Polymer-Gruppe mit einem Durchmesser von 20 bis 200 nm. handeln.

25
Fig. 2 zeigt eine schematische Teilansicht eines Detektors. An eine aus Kunststoff hergestellte feste Phase D ist über das Spacermolekül 2 eine zweite PNA 5 gebunden. An das 5'-Ende der zweiten PNA 5 ist eine erste fluorophore Gruppe 6
30 gebunden. Eine dritte PNA 7, die abschnittsweise korrespondierend zur zweiten PNA 5 ausgebildet ist, ist mit ihrem 5'-Ende über ein weiteres Spacermolekül 2 an die feste Phase D

Quencher	Fluorophor
DABCYL	Coumarin
DABCYL	EDANS
DABCYL	Fluorescein
DABCYL	Lucifer-Yellow
DABCYL	Bodipy
DABCYL	Eosin
DABCYL	Tetramethylrhodamin
DABCYL	Texas-Red
DABCYL	Erythrosin

Die Fig. 3 a bis c zeigen das Verhalten der Markierung unter dem Einfluß eines Magnetfelds. Bei Anlegen eines entsprechend orientierten Magnetfelds werden die magnetischen Partikel 4 von der Oberfläche des Festkörpers 1 wegbewegt.

Fig. 4 zeigt nochmals die Oberfläche des Detektors gemäß Fig. 2. Daraus ist ersichtlich, dass an der Oberfläche der festen Phase D mit zweiten fluorophoren Molekülen bzw. Quenchern 8 versehene dritte PNA 7 im Überschuß über Spacermoleküle 2 an die Oberfläche gebunden sind. Damit ist sichergestellt, dass im Falle der Benutzung eines Quenchers 8 - die Fluoreszenz des ersten fluorophoren Moleküls 6 gelöscht wird, so lange der Detektor nicht im Kontakt mit einer ersten korrespondierend zur zweiten PNA 5 ausgebildeten PNA 3 ist.

Fig. 5 zeigt die Markierung gemäß Fig. 1 im Kontakt mit dem Detektor gemäß Fig. 3. Die erste PNA 3 hybridisiert mit der zweiten PNA 5 des Detektors. Die dritte PNA 7 ist von der zweiten PNA 5 getrennt. Es besteht keine Wechselwirkung zwischen dem ersten fluorophoren Molekül 6 und Quencher 8 mehr. Dadurch wird eine Fluoreszenzreaktion hervorgerufen. Im Falle

Die Fig. 7b, 8b und 9b zeigen jeweils den Hybridisierungszustand.

Fig. 10a zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel. Dabei ist die zweite PNA 5 unmittelbar mit ihrem 3'-Ende an die feste Phase D gebunden. Am 5'-Ende befindet sich das erste fluorophore Molekül 6. Die dritte PNA 7 ist mit ihrem 5'-Ende unmittelbar an der festen Phase D gebunden. Am 3'-Ende der dritten PNA 7 befindet sich in diesem Fall ein zweites fluorophores Molekül 8. Im Hybridisierungsfall binden die zweite PNA 5 und die dritte PNA 7 so an die erste PNA 3, dass eine räumliche Beziehung zwischen dem ersten 6 und dem zweiten fluorophoren Molekül 8 entsteht. Es kommt in diesem Ausführungsbeispiel nach dem Förster-Effekt zu einem strahlungslosen Energieübergang vom zweiten 8 auf das erste fluorophore Molekül 6 und damit zu einer verstärkten Fluoreszenzreaktion.

Beispiel 1:

Design und Synthese eines Markierungsnukleotids und eines Detektornukleotids

Als Markierungsmittel wird ein aus 32 Nukleotiden bestehendes Oligonukleotid folgender Sequenz synthetisiert:

5'-CCAAGC CTGGAGGGATGATACTTT GCGCTTGG-3'

Als Detektionsmittel wird ein aus 32 Nukleotiden bestehendes Oligonukleotid synthetisiert, das komplementär zu der Sequenz des Markierungsmittels bzw. -nukleotids ist:

3'-X-GGTTCG GACCTCCCTACTATGAAACG CGAACC-6FAM-5'

In der hybridisierten Struktur ist die 5'-6FAM von der 3'-X-Gruppe des Detektornukleotids räumlich getrennt. Damit ist ein Energietransfer zwischen der 6FAM und der DABCYL-Gruppe nicht mehr möglich. Bei einer entsprechenden Anregung der 6FAM-Gruppe kommt es dementsprechend zu einer ungestörten Fluoreszenz der 6FAM-Gruppe.

Zum Nachweis eines Fluoreszenz-Energietransfers werden Detektor- und Markierungsnukleotid in 10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH8 (TE) gelöst. Zu 100µl einer 1µM-Lösung des Detektornukleotids werden das gleiche Volumen einer 2µM-Lösung des Markierungsnukleotids bzw das gleiche Volumen TE zugefügt. Zum Nachweis der Hybridisierung wird die Fluoreszenz der Lösung bei einer Anregung mit 496nm und einer Emission von 516nm bestimmt. Durch die Mischung der Nukleotide steigt die Fluoreszenz um einen Faktor von ca. neun an (Fig. 11). Die Erhöhung der Fluoreszenz zeigt die Aufhebung des intramolekularen Fluoreszenz-Energie-Transfers des Detektornukleotids aufgrund einer Hybridisierung von Detektor- und Markierungsnukleotid an.

Beispiel 2:

Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit von Hybriden aus Detektor- und Markierungsnukleotiden

Zur Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit von Hybriden aus Detektor- und Markierungsnukleotiden wird die Fluoreszenz einer absteigenden Konzentrationsreihe von Hybriden aus Markierungs- und Detektornukleotid gemessen. Dazu werden Tropfen mit einem Volumen von jeweils 1µl einer 1µM-Lösung des Markierungsnukleotids auf einen Objektträger gegeben. Zu jedem

1µl der Markierungsnukleotid-Lösung wird mit einer 2µl Pipette in Form von Linien auf einen polierten Objektträger aufgetragen. Die Flüssigkeit wird bei Raumtemperatur eingetrocknet. Fig. 12 a zeigt einen solchen beschichteten Objektträger. Das Markierungsnukleotid ist in Form der hellen Stellen erkennbar. Auf einem zweiten Objektträger wird auf einer Fläche von ca. 40mm² 5µl einer 20nM-Lösung des Detektornukleotids aufgetragen und ebenfalls bis zur Trocknung bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach werden die Objektträger mit den Seiten die Markierungsnukleotide tragenden, aufeinander gelegt und mit einem Anpressdruck von ca. 400N/cm² für eine Minute zusammen gepreßt. Dann werden die Objektträger im Fluoreszenzmikroskop bei einer 500-fachen Vergrößerung untersucht. Das aufgetragene Markierungsnukleotid kann anhand der DAPI-Färbung nachgewiesen werden. Das Detektornukleotid ist im nicht-hybridisierten Zustand nicht nachweisbar. Im hybridisierten Zustand kann das Detektornukleotid anhand der FAM-spezifischen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz des Detektornukleotids ist nur in dem Bereich des aufgetragenen Markierungsnukleotids zu beobachten (Fig. 12 b). Die beobachtete Fluoreszenz des Detektornukleotids im Bereich des aufgetragenen Markierungsnukleotids ist ein Nachweis für die Hybridisierung des Markierungsnukleotids mit dem Detektornukleotid.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren einer an einem Festkörper
(1) vorgesehenen ersten Nukleotidsequenz (3) aufwei-
5 sendenden Markierung, wobei die erste Nukleotidsequenz (3)
mit einer zur ersten (3) korrespondierenden zweiten
Nukleotidsequenz (5) aufweisenden Detektionsmittel in
Kontakt gebracht wird, wobei die zweite Nukleotidsequenz
(5) mit ihrem ersten Ende an eine feste Phase (D) gebun-
10 den ist und am zweiten Ende eine erste fluorophore Grup-
pe (6) aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei beim Inkontaktbringen
die erste (3) und die zweite Nukleotidsequenz (5) hybri-
15 disieren.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
vor oder beim Inkontaktbringen eine Hybridisierung der
ersten Nukleotidsequenz (3) mit einer dritten Nukleo-
20 tidsequenz (3) gelöst wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
bei der Hybridisierung der ersten (3) und zweiten Nu-
kleotidsequenz (5) eine Fluoreszenzreaktion ausgelöst
25 wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die erste Nukleotidsequenz (5) beim Inkontaktbringen
durch Magnetwirkung in Richtung des Detektionsmittels
30 bewegt wird.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Detektionsmittel einen Magneten aufweist.
- 5 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei das erste Ende der zweiten Nukleotidsequenz (5) über Spacermoleküle (2) an die feste Phase (D) gebunden ist.
- 10 15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, wobei das Detektormittel eine dritte Nukleotidsequenz (7) aufweist, die zumindest abschnittsweise zur ersten (3) oder zweiten Nukleotidsequenz (5) korrespondierend ausgebildet ist.
- 15 16. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, wobei ein erstes Ende der dritten Nukleotidsequenz (7) über Spacermoleküle (2) an die feste Phase (D) gebunden ist.
- 20 17. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei an einem zweiten Ende der dritten Nukleotidsequenz eine zweite fluorophore Gruppe oder ein Quencher vorgesehen ist.
- 25 18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei die zweite und die dritte Nukleotidsequenz bei der Identifizierung im hybridisierten Zustand vorliegen, so dass eine Wechselwirkung zwischen dem ersten fluorophoren Molekül und dem zweiten fluorophoren Molekül bzw. dem Quencher sich ausbildet oder unterbrochen wird.
- 30 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 18, wobei die erste (3), zweite (5) und dritte Nukleotidsequenz (7) aus DNA oder PNA gebildet ist.

1/10

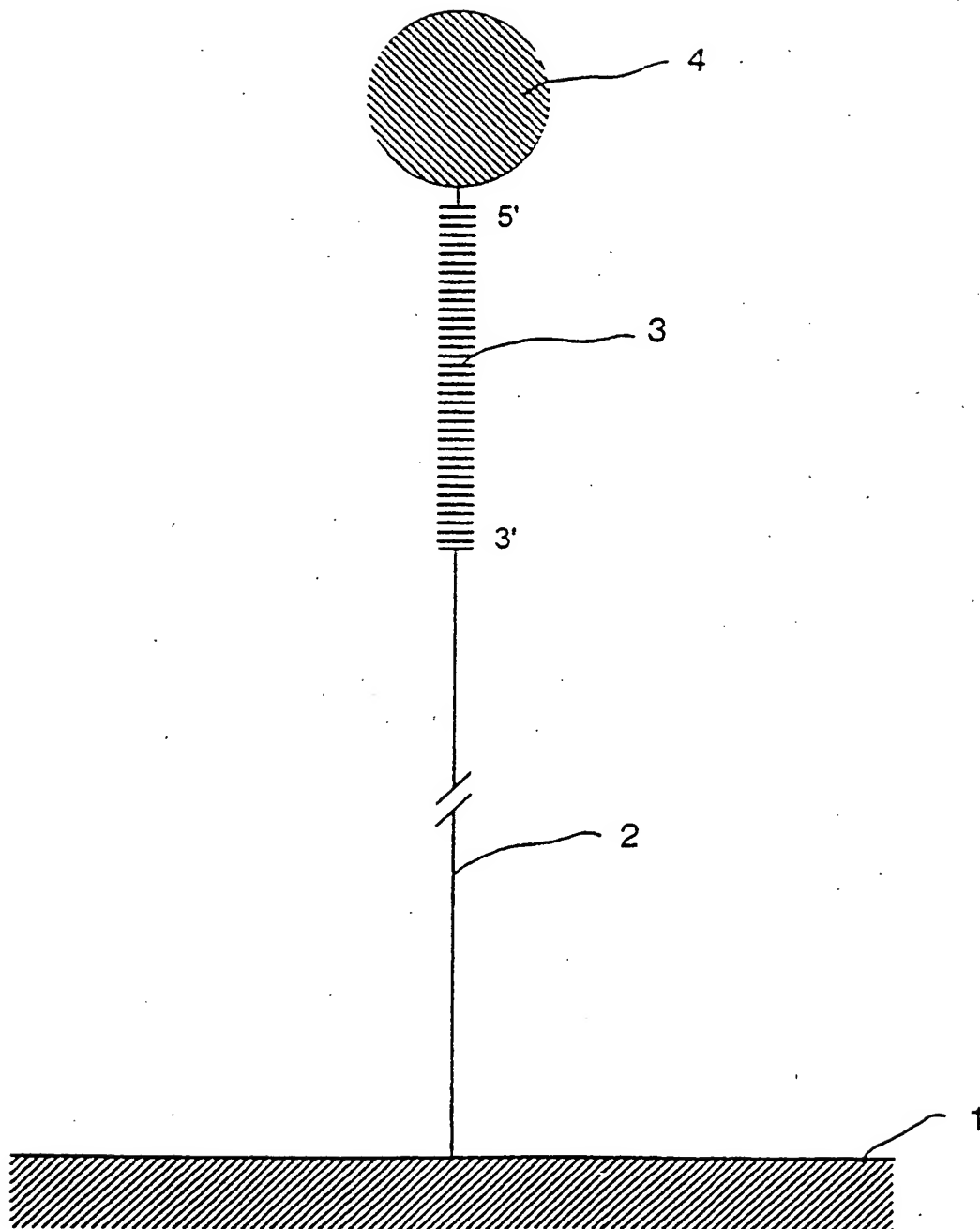


Fig. 1

2/10

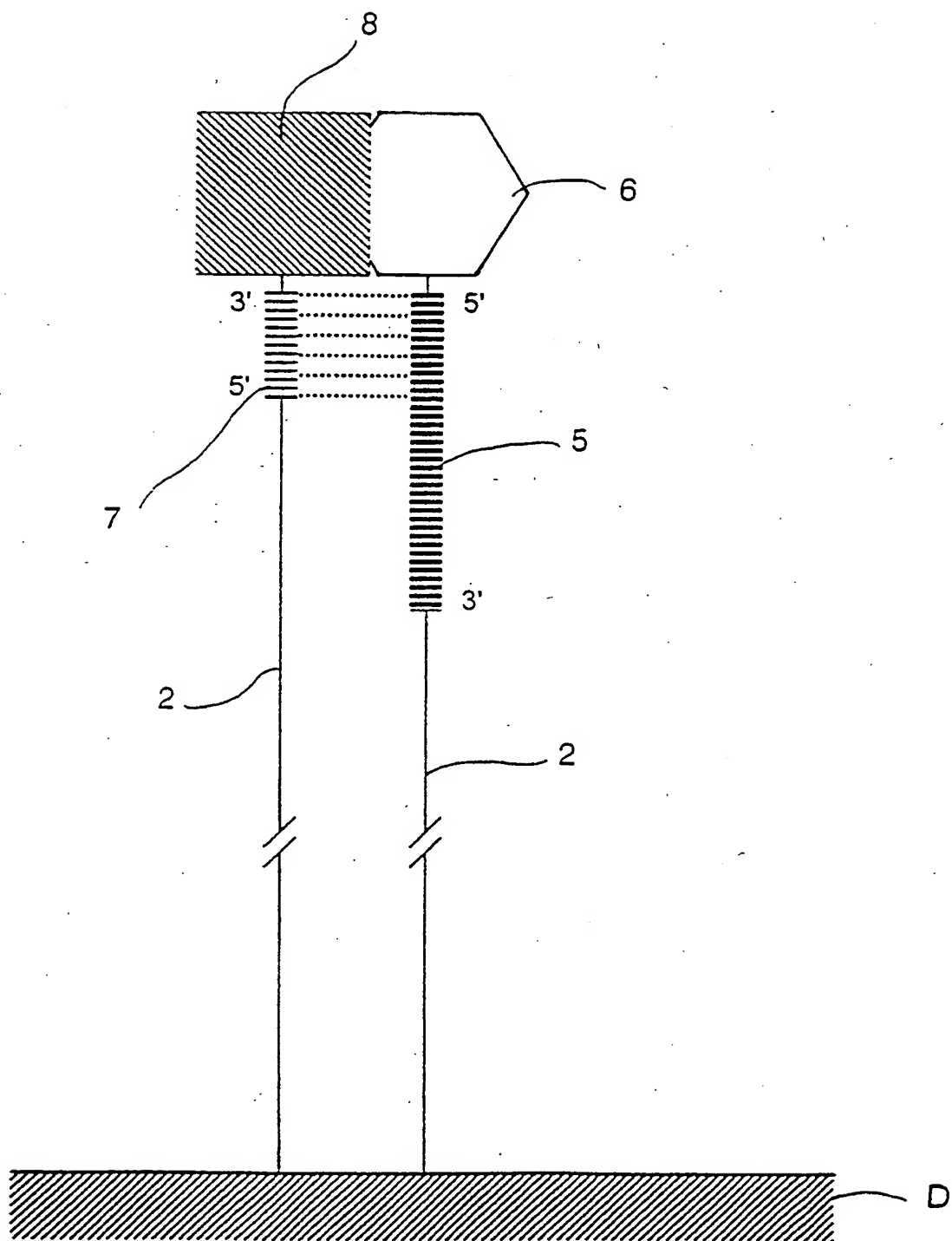


Fig. 2

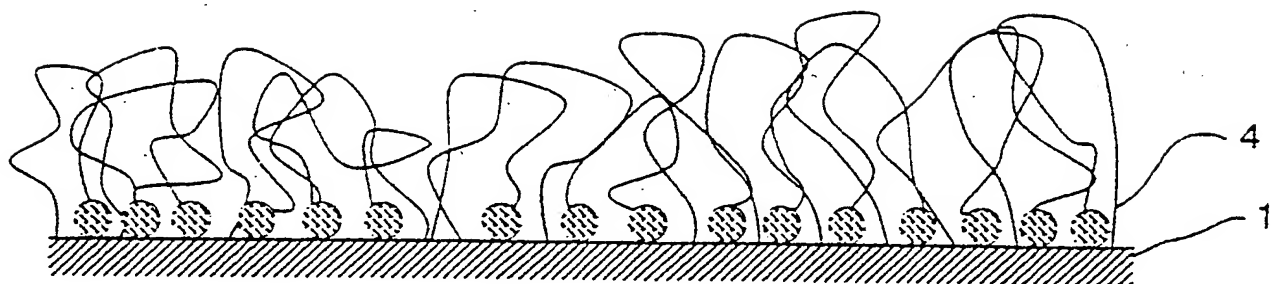


Fig. 3a

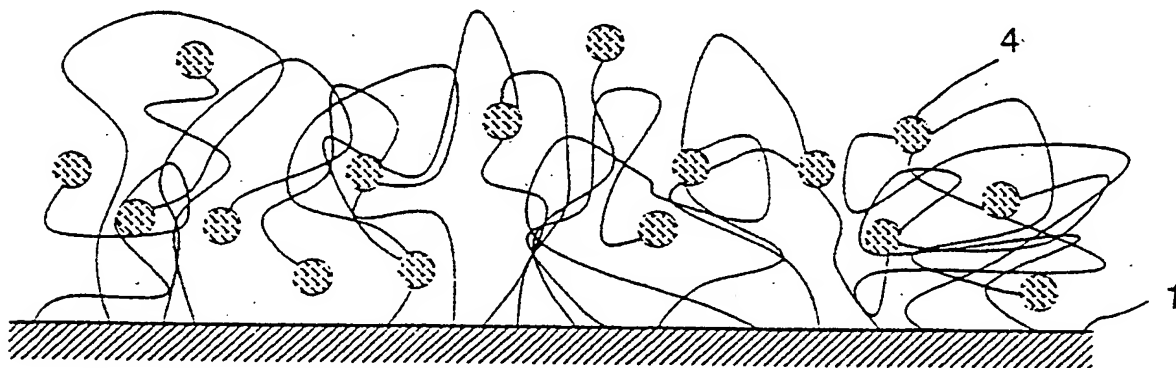


Fig. 3b

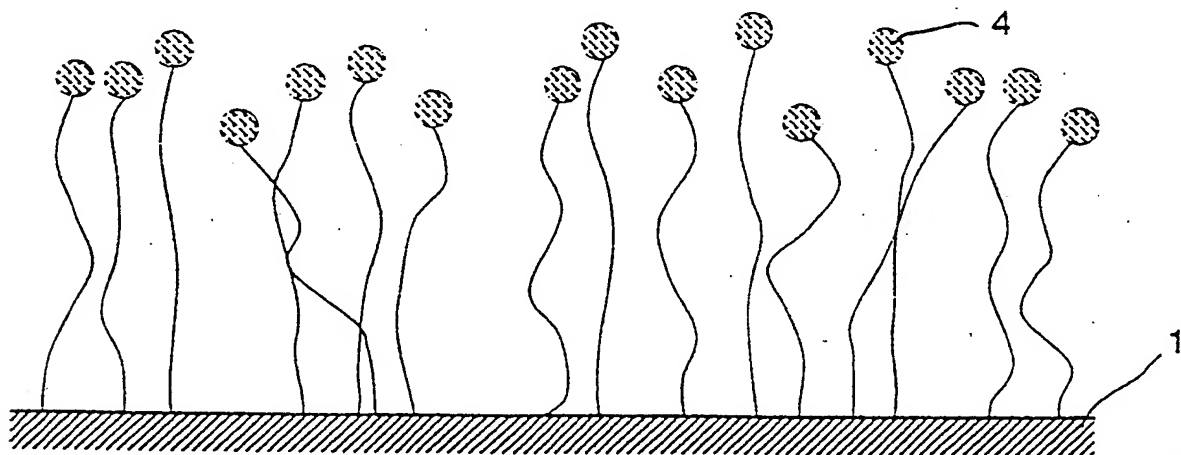


Fig. 3c

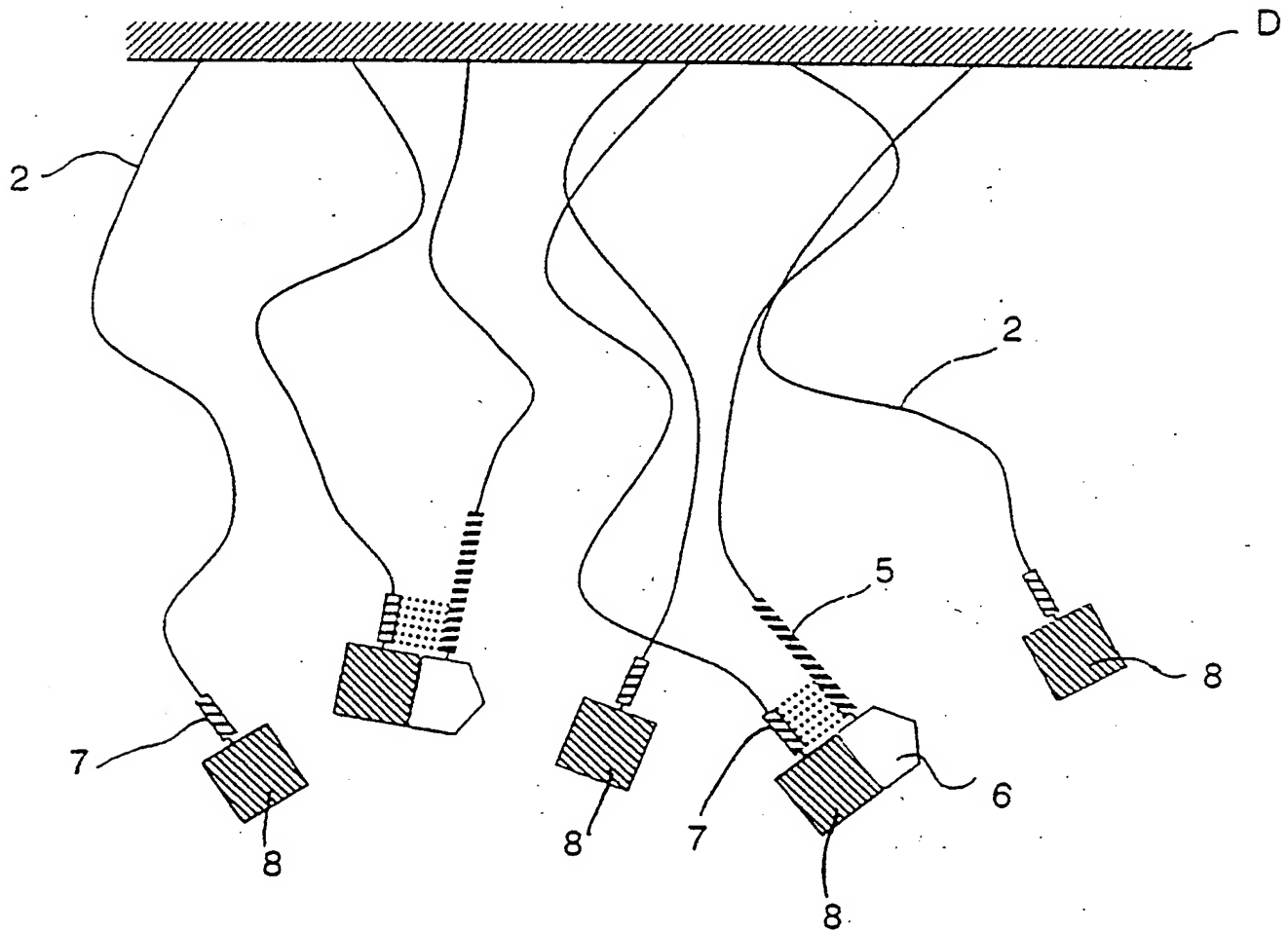


Fig. 4

5/10

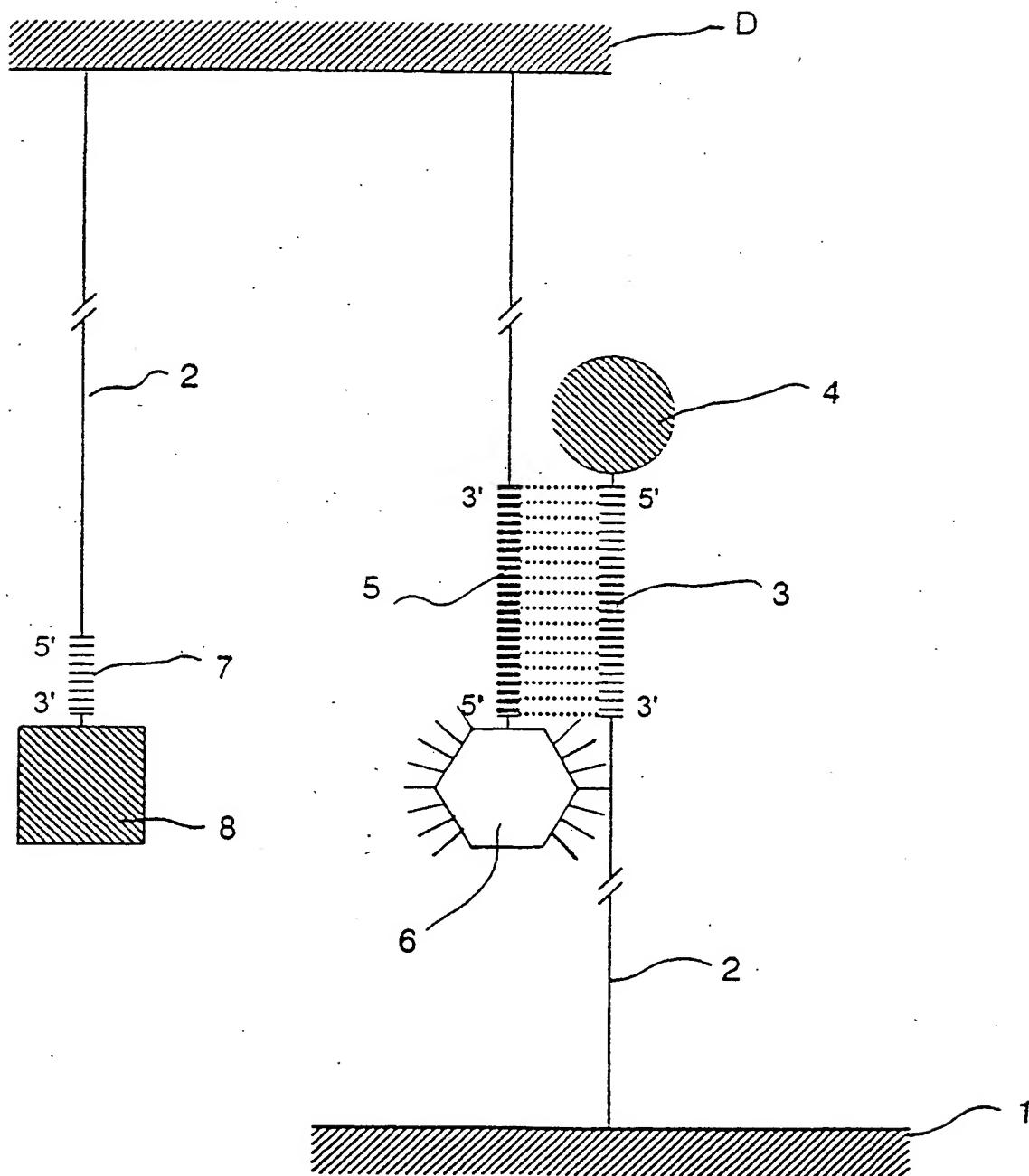


Fig. 5

6/10

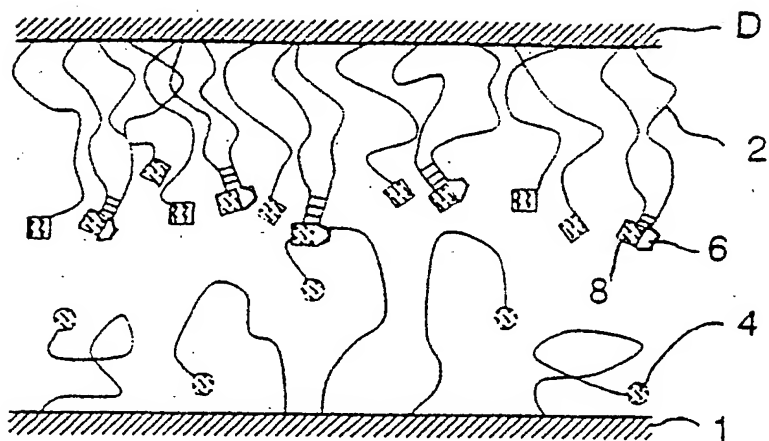


Fig. 6a

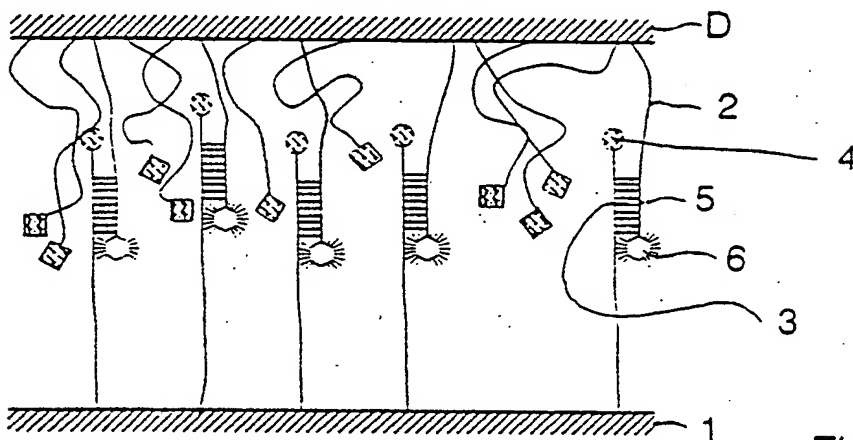


Fig. 6b

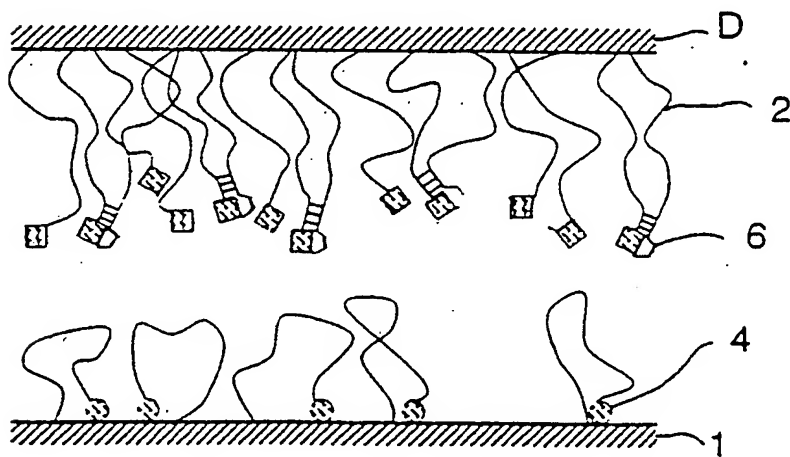


Fig. 6c

7/10

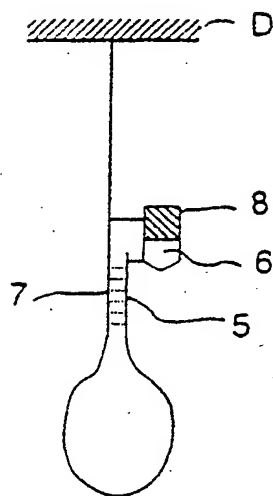


Fig. 7a

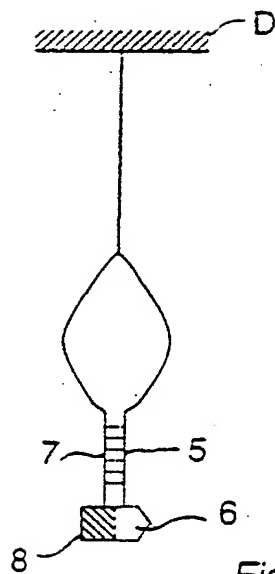


Fig. 8a

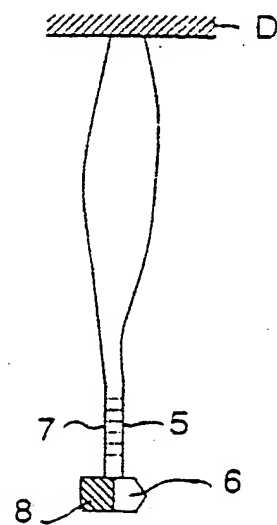


Fig. 9a

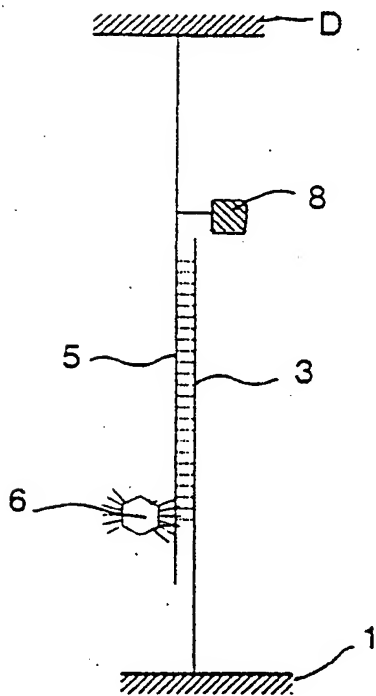


Fig. 7b

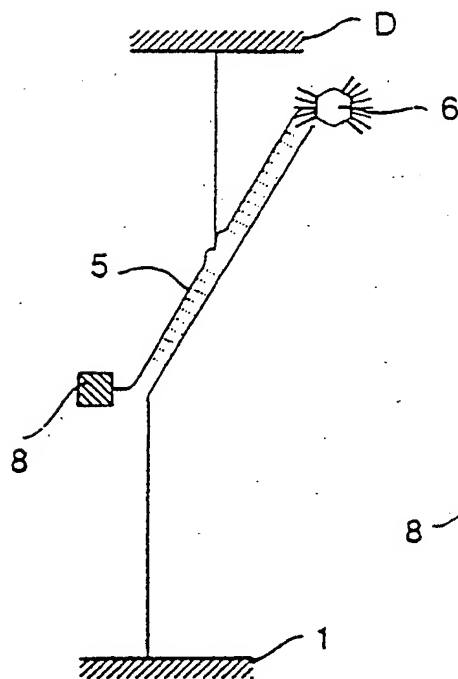


Fig. 8b

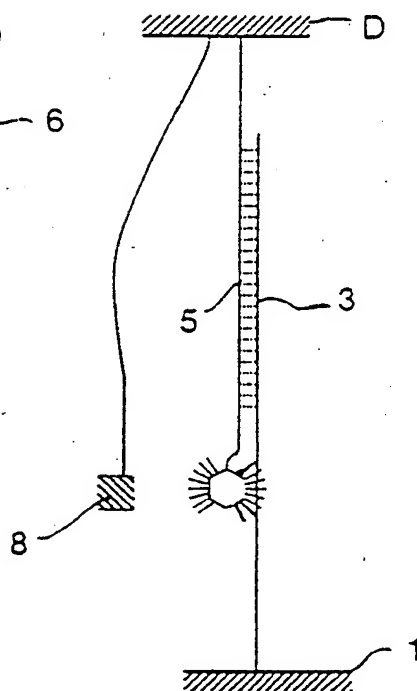


Fig. 9b

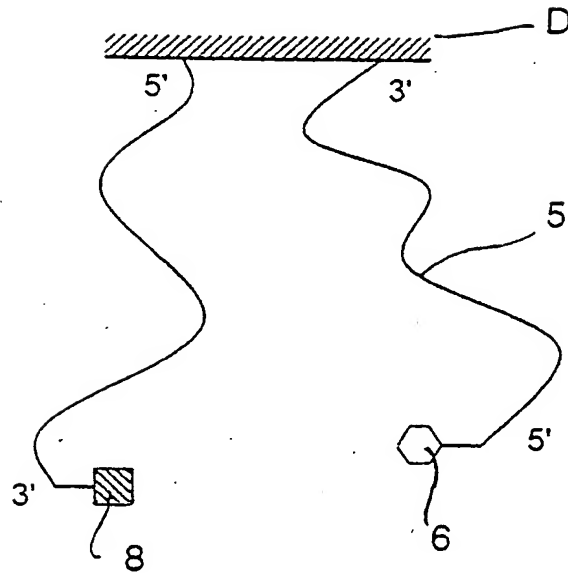


Fig. 10a

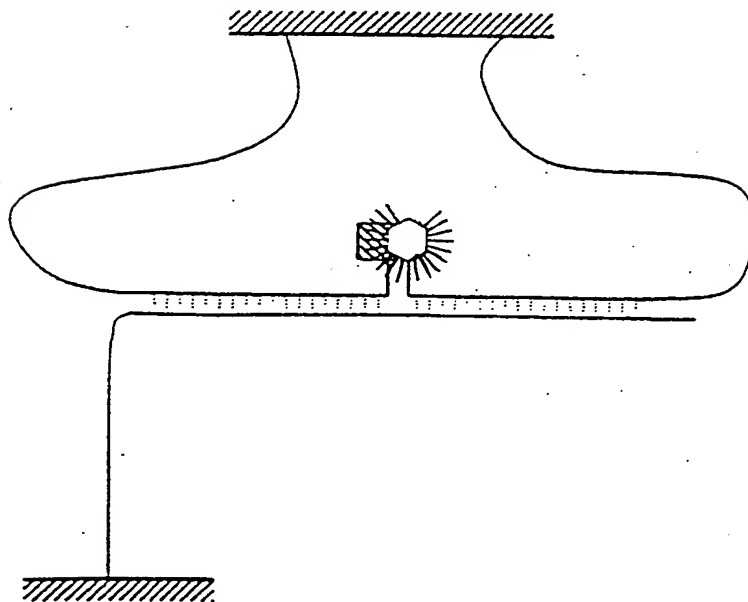


Fig. 10b

9/10

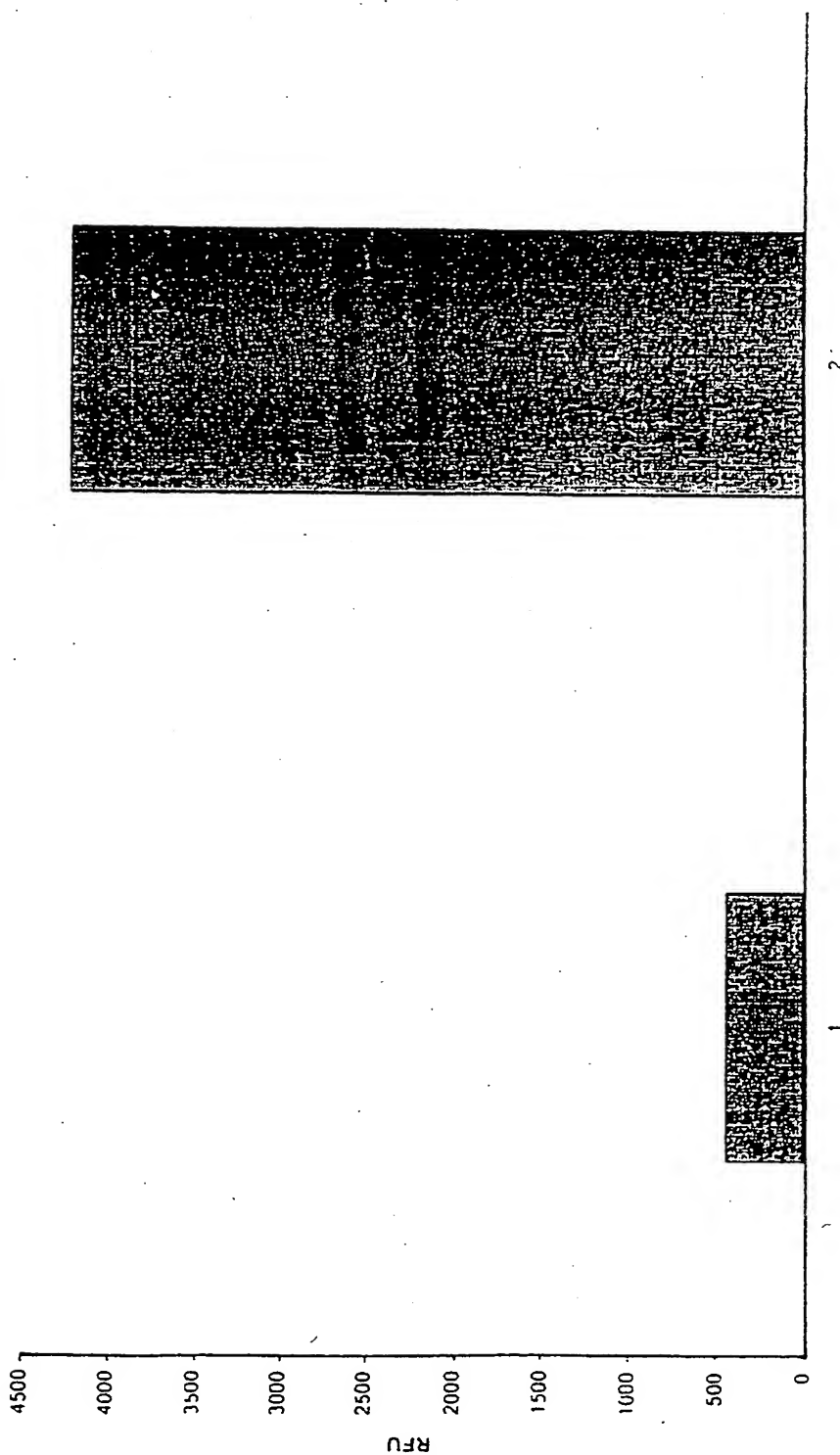


Fig. 11

10/10

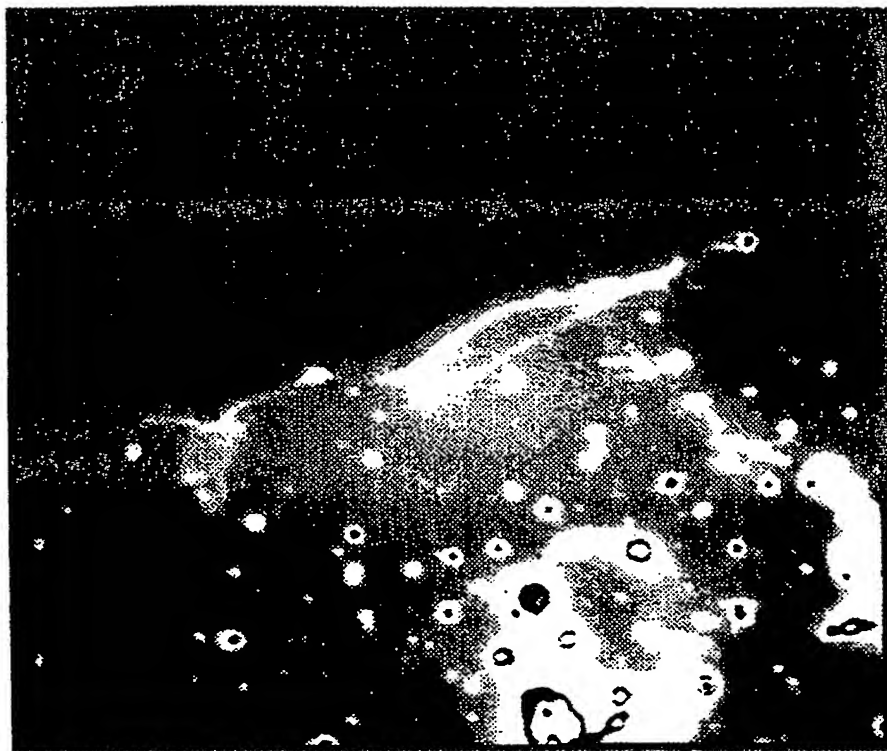


Fig. 12 a



Fig. 12 b

SEQUENZPROTOKOLLE

<110> november AG Novus Medicatus Bertling Gsellshaft für Molekulare
Medizin

5

<120> Verfahren und Vorrichtung zum Identifizieren einer
Markierung

<130> 380293ga5

10

<140>

<141>

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

20

<212> DNA

<213> human

<400> 1

ccaagcctgg agggatgata ctttgcgctt gg

32

25

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> human

30

<400> 2

ccaagcgcaa agtatcatcc ctccaggctt gg

32